

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Estructura filogenética de comunidades de macroinvertebrados en una
cuenca con influencia glacial.**

**Disertación previa a la obtención del título de Licenciada en Ciencias
Biológicas**

SOFIA CAROLINA AMORES SANDOVAL

QUITO, 2018

CERTIFICADO

Certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas de la candidata Sofía Carolina Amores Sandoval ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto pude ser presentada para la calificación correspondiente.

Ph.D. Verónica Crespo-Pérez

Directora de Disertación

Quito, 12 de septiembre de 2018

DEDICATORIA

*“All your dreams can come true if you have
the courage to pursue them”*

Walt Disney.

A mis padres y a mi hermana

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer primero a Dios por haber estado a mi lado guiándome a lo largo de toda mi vida universitaria, por ser mi pilar y mi fortaleza en momentos de incertidumbre y por llenar mi vida de bendiciones y aprendizajes.

A mis padres por todo el apoyo, amor y paciencia incondicionales brindados durante esta etapa y a lo largo de mi vida, por sus valiosos consejos y su ejemplo de superación que me incentivaron siempre a seguir adelante.

A mi hermanita “Juerch” por estar conmigo en los momentos felices y más aún en los difíciles dándome siempre ánimos para seguir adelante, por nunca perder la confianza y fe en mí, por ser mi compañera de aventuras, de juegos, de estudio y demostrarme que no importan las malas noches siempre que el sueño a seguir siempre este vigente en nuestra mente y corazón.

Agradezco de manera especial a mi directora de disertación, PhD. Verónica Crespo-Pérez, por aventurarse conmigo en la realización de este gran proyecto, brindándome su apoyo incondicional, sus consejos y sabiduría en todas las fases de este estudio. De igual forma a los miembros del jurado por su importante aporte en la fase final, por estar presentes, y ser parte de este gran logro.

A Rodrigo Espinoza y Patricio Andino, por su gran ayuda y enseñanzas, tanto en el campo como en el laboratorio,

A Daniel Romero y Elain Torres por su asistencia en la fase de campo y laboratorio y por su apoyo y ayuda.

Al Dr. Santiago Ron, por permitirme el uso del laboratorio de Biología Molecular de Herpetología para el estudio, a Gabriela Castillo por sus enseñanzas, consejos, paciencia y ayuda incondicional en la fase de laboratorio.

De igual manera quiero agradecer al Dr. Miguel Pinto, Francisca Hervas, Simón Lobos, por la ayuda brindada en la fase de análisis de datos, por sus excelentes sugerencias en esta fase del estudio; a Elcy Vilaña, en la etapa final, con los gráficos y anexos de esta disertación.

También de manera especial, quiero agradecer a Andrés Jara por su cariño, paciencia y apoyo a lo largo de este proyecto, por enseñarme que nunca es tarde para alcanzar las metas y sueños.

A mis grandes amigos y compañeros que han estado conmigo a largo de mi carrera, Josu, Mich, Caro, Pao, Mabe, y a todos mis demás compañeros de aula.

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, por la enseñanza brindada en estos años y las instalaciones donde se llevó a cabo el presente trabajo. Finalmente, la fase de campo y laboratorio de este trabajo fueron financiados por los proyectos: Arca de Noé (Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación, SENESCYT, S. Ron y O. Torres-Carvajal, investigadores principales) y Contribución de los ríos de cabeceras a la biodiversidad de cuencas hidrográficas (Proyecto PUCE 2015, V. Crespo, directora).

TABLA DE CONTENIDOS

1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	3
3. INTRODUCCIÓN.....	5
4. OBJETIVOS.....	10
4.1. GENERAL	10
4.2. ESPECÍFICOS	10
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
5.1. ÁREA DE ESTUDIO.....	11
5.2. COLECCIÓN DE ESPECÍMENES	11
5.3. EXTRACCIÓN, PCR Y SECUENCIACIÓN DE ADN.....	12
5.4. ENSAMBLAJE, EDICIÓN Y ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS.....	14
5.5. ANÁLISIS FILOGENÉTICOS.....	14
5.5.1. CONSTRUCCION DEL ÁRBOL FILOGENÉTICO.....	14
5.5.2. ESTRUCTURA FILOGENÉTICA	15
5.6. VARIABLES AMBIENTALES.....	17
5.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	17
6. RESULTADOS	18
6.1. ÁRBOL FILOGENÉTICO.....	18
6.2. ESTRUCTURA FILOGENÉTICA DE COMUNIDADES Y SU RELACIÓN CON VARIABLES AMBIENTALES	18
7. DISCUSIÓN.....	21
7.1 RELACIONES FILOGENÉTICAS DE INSECTOS ACUÁTICOS PRESENTES EN EL ÁREA DE ESTUDIO.....	21

7.2 ESTRUCTURA FILOGENÉTICA.....	21
8. CONCLUSIONES.....	25
9. LITERATURA CITADA.....	26
10.FIGURAS.....	36
11. TABLAS.....	44
12. ANEXOS.....	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ríos con distintas contribuciones de agua (glaciar, vertiente y mixto).....	37
Figura 2. Mapa del área de estudio (ACHA).....	38
Figura 3. Árbol ultramétrico resultante de secuencias de ADN mitocondrial (COI) insectos acuáticos.....	39
Figura 4. Gráficos de dispersión Índice Glaciar vs NRI a) modelo nulo de especies al azar, b) modelo nulo de intercambio independiente.....	40
Figura 5. Mapa del Antisana donde se muestran los 50 sitios, riqueza de taxones y sus respectivos NRIs (modelo nulo de especies al azar).....	41
Figura 6. Mapa del Antisana donde se muestran los 50 sitios, riqueza de taxones y sus respectivos NRIs (modelo nulo de intercambio independiente).....	42
Figura 7. Análisis de componentes principales que muestra la relación entre variables ambientales y NRIs a) modelo nulo de especies al azar, b) modelo nulo de intercambio independiente.....	43

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Especímenes y secuencias obtenidas en el Laboratorio de Biología Molecular, GenBank y BOLD utilizados en el presente estudio.....	46
Tabla 2. Protocolos de amplificación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para el gen Citocromo Oxidasa I.....	47
Tabla 3. Cargas de las variables, autovalores y porcentajes de variación resultantes del análisis de componentes principales de siete variables ambientales.....	48

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de extracción de ADN con CTAB (invertebrados).....	50
Anexo 2. Puntos de calibración utilizados para la construcción del árbol ultramétrico (Misof et al., 2014) Material Suplementario.....	51

1. RESUMEN

Las cuencas glaciares albergan arroyos con distintas contribuciones de agua, como aquella proveniente del deshielo glaciar, de fuentes subterráneas o de precipitación. Las mezclas entre ríos de distinto origen producen una alta heterogeneidad ambiental. Esto, sumado a la hostilidad ambiental, asociada a las aguas de deshielo, influye sobre el ensamblaje de las comunidades acuáticas en estas cuencas. Se han realizado diversos estudios de las comunidades de insectos acuáticos, en cuencas glaciares altoandinas, principalmente enfocados en la diversidad taxonómica y, recientemente funcional, pero son escasos los trabajos que han incluido información genética. Dentro de un contexto de metacomunidades, conocer la estructura filogenética de las comunidades locales contribuye a la comprensión de los procesos que rigen su ensamblaje. En el presente trabajo, evaluamos la composición filogenética de comunidades de insectos acuáticos de río en 50 sitios en una cuenca con influencia glaciar en los Andes de Ecuador. Buscamos dilucidar los patrones involucrados en su ensamblaje, a través del análisis de niveles de agregación o dispersión filogenética, a lo largo de gradientes ambientales. Nuestros resultados revelaron que, solo a altos niveles de influencia glaciar, existe agregación filogenética, probablemente relacionada con filtrado ambiental, ya que en condiciones extremas pocos grupos consiguen evolucionar y adaptarse. Nuestros resultados mostraron, además, que variables como la turbidez, la conductividad y la temperatura se relacionan con la agregación filogenética. Por otro lado, encontramos que en la mayoría de sitios y a lo largo de todo el gradiente de hostilidad ambiental existe ausencia de estructura filogenética, probablemente a altos niveles de dispersión entre comunidades locales. Los resultados obtenidos en este estudio constituyen información inédita que aporta a un

mejor entendimiento de los factores que rigen la estructura de estos ecosistemas únicos y a su vez fuertemente amenazados.

Palabras clave: estructura filogenética, comunidades, cuenca glaciar, insectos acuáticos, variables ambientales

2. ABSTRACT

Glacial catchments harbor streams with different water contributions, such as glacial melt, ground water or precipitation. Confluences between streams from different sources produce high levels of environmental heterogeneity. This, added to environmental hostility, characteristic of glacier-fed streams, influences the assemblage of aquatic communities. Previous studies of aquatic communities in high-Andean catchments have mainly focused on taxonomic, and most recently, functional diversity, but, to our knowledge, few investigations have included genetic information. Within a metacommunity context, information about the phylogenetic structure of local communities may contribute to the understanding of the processes that govern their assemblage. In the present study, we evaluated the phylogenetic structure of stream macroinvertebrate communities in 50 sites within a glacierized catchment in the Ecuadorian Andes. We seek to elucidate the patterns involved in their assemblage, through the analysis of levels of phylogenetic aggregation or dispersion, along environmental gradients. Our results revealed that phylogenetic aggregation predominates at greater glacial influence, probably related to environmental filtering, because under extreme conditions few groups manage to evolve and adapt. Our results also showed that variables such as turbidity, conductivity and temperature are related to the level of phylogenetic aggregation. On the other hand, we found that most sites along the whole glacier index gradient harbor communities with no phylogenetic structure, probably because of high levels of macroinvertebrate dispersal between the stream sites. The results obtained in this study provide unprecedented information that contributes to a better understanding of the factors that govern the structure of these unique and deeply threatened ecosystems.

Keywords: phylogenetic structure, communities, glacial catchments, macroinvertebrates, environmental variables.

3. INTRODUCCIÓN

Los glaciares se encuentran distribuidos alrededor del mundo y cubren casi un 10% de la superficie de la Tierra (National Snow and Ice Data Center, s.f; Francou et al., 2000). La mayor parte de glaciares se encuentran ubicados a latitudes altas, pero también en áreas montañosas de otras latitudes. Entre los glaciares de montaña, la mayoría se encuentran en zonas templadas (eg. Alpes, Himalaya, Rocallosas) y alrededor del 5% están en zonas tropicales (Sudamérica, África y Nueva Guinea, Francou et al., 2000). Más del 99% de los glaciares tropicales se ubican en los Andes, distribuidos en Perú (70%), Bolivia (20%), Ecuador (4%) y Colombia-Venezuela (4%) (Francou et al., 2011). En el Ecuador, la cobertura glaciar es probablemente menor a 50 km² y se encuentra concentrada en los volcanes nevados Chimborazo, Altar, Carihuaírazo, Illiniza Sur, Cotopaxi, Cayambe y Antisana (Francou et al., 2011).

El calentamiento global produce el retroceso, cada vez más acelerado, de los glaciares alrededor del mundo. Es así, que en las últimas décadas, y en especial los últimos treinta años, los glaciares han perdido el 35% de su superficie y el 50% de su volumen (Francou, 2013). Existen casos extremos de pérdida total de glaciares, como por ejemplo, el ya extinto glaciar Chacaltaya en Bolivia (Francou, 2013; Francou et al., 2011). En el Ecuador, entre 1976 y 2006, los glaciares han sufrido un retroceso de entre el 30 y 50% de su superficie. El volcán nevado Cotopaxi, por ejemplo, ha perdido aproximadamente 45% de su cobertura glaciar durante ese período, mientras que el glaciar 15a del Antisana ha retrocedido 0,32 km en 15 años (1994-2011), lo que equivale a un promedio de 6-8 m por año (Francou et al., 2011; Cáceres et al., 2008). Al ser reservorios importantes de agua, especialmente en épocas de sequía, el retroceso glaciar produce impactos sobre los recursos hídricos utilizados para el

consumo y diversas actividades humanas (Cauvy-Fraunié, 2014). Además, cambios en las condiciones hidrológicas en ríos y cuencas alimentadas por glaciares, producidos por cambios en el suministro de agua hacia los ríos, generan impactos sobre la biodiversidad y el funcionamiento de ecosistemas, con potenciales impactos sobre los servicios ambientales brindados por las comunidades acuáticas (eg. reciclaje de nutrientes, purificación del agua, Cauvy-Fraunié et al., 2016).

Las cuencas con influencia de glaciares albergan ríos alimentados por distintas fuentes de agua. Estos ríos generalmente se clasifican en tres grupos, dependiendo de su origen: ríos alimentados por glaciares, ríos de vertiente (agua subterránea) y ríos de drenaje (alimentados por precipitaciones), los cuales presentan características particulares, que los diferencian de los ríos de distinto origen (Jacobsen & Dangles, 2017). Los ríos alimentados por agua de deshielo son bastante turbios (la fricción del glaciar contra las rocas libera polvo glaciar, el cual es acarreado por el agua que proviene del derretimiento del glaciar) y la temperatura del agua es baja; se caracterizan, además, por ser muy inestables y por presentar crecidas glaciares diarias relacionadas con el derretimiento del glaciar que ocurre todos los días. Los ríos de vertiente son más estables, con menos turbidez y mayor temperatura. Por último, los ríos de drenaje se caracterizan por su origen en los páramos, ya que su principal función es el drenaje de aguas que se encuentran en ellos; además, por tener condiciones intermedias entre los ríos de glaciar (inestables) y los de vertiente (estables) (Milner et al., 2001; Brown et al. 2003). Esta variación de las características hidrológicas y físico-químicas entre los ríos de una misma cuenca (inclusive entre ríos aledaños, (Fig. 1), genera una alta heterogeneidad ambiental, la cual contribuye al recambio de especies acuáticas entre comunidades locales y a una mayor diversidad regional (Espinosa, 2014; Quenta et al., 2016).

Los macroinvertebrados acuáticos (tamaño > 1mm) están representados por organismos de diversos fila, la mayoría insectos, pero también moluscos, platelmintos y nematodos (Mohmad et al., 2015; Hauer & Resh, 2017). Algunas especies de insectos acuáticos pasan solo durante su etapa larvaria o de ninfa en el agua, mientras que otros poseen etapas larvarias y adultas acuáticas. Los macroinvertebrados ocupan hábitats variados en los ríos, ubicándose generalmente en el lecho, adheridos a las rocas o en la materia vegetal de la rivera (Roldán-Pérez, 2016; Hanson et al., 2010). La importancia de estos organismos y la creciente atención que reciben de los ecólogos de río radican en el rol que desempeñan dentro de los ecosistemas acuáticos, como transportadores y transformadores de materia orgánica (Hauer & Resh, 2017) y como partes esenciales de las redes tróficas, tanto acuáticas como terrestres. Además, estos organismos constituyen un vínculo clave entre el medio acuático y el terrestre circundante (Carew et al., 2017). Adicionalmente, son considerados indicadores biológicos del estado ecológico de los sistemas acuáticos debido a su ubicuidad, la facilidad con la que se los puede recolectar y la alta sensibilidad de varios grupos a las condiciones hidrológicas y físico-químicas del agua en la que habitan (Carew et al., 2017; Mohmad et al., 2015; Roldán-Pérez, 2016).

Las comunidades de macroinvertebrados acuáticos de cuencas glaciares se han estudiado principalmente en regiones templadas (eg. Brown & Milner, 2012; Füreder, 2007; Ilg & Castella, 2006; Milner et al, 2001; Milner & Petts, 1994). Los estudios en los trópicos son más escasos y se han enfocado principalmente en diversidad taxonómica (Jacobsen et al., 2014a; Jacobsen & Dangles, 2012), distribución (Madsen et al., 2015) y en la estructura de comunidades acuáticas (Cauvy-Fraunié et al., 2015). En cambio, casi no hay estudios sobre diversidad funcional (Crespo-Pérez et al., *en prep*) y existe escasa información acerca de la

diversidad genética de poblaciones o comunidades de invertebrados acuáticos (Finn et al., 2016).

En un contexto de metacomunidades, la filogenética (área de investigación encargada de dilucidar las relaciones de parentesco de los organismos a distintos niveles taxonómicos en base a caracteres moleculares homólogos) (Conogasi, 2015; Lemey et al., 2009) proporciona información importante que puede ayudar a entender los procesos que rigen el ensamblaje y estructura de las comunidades locales (Webb 2000, Graham et al., 2009). En términos ecológicos, una comunidad es una asociación de especies que ocupan una zona geográfica determinada y que interactúan entre sí (McPeck & Miller, 1996). Estudios previos sugieren que comunidades donde las interacciones bióticas (eg. competencia interespecífica) tienen alta importancia, tendrán especies lejanamente relacionadas (Kembel & Hubbel, 2006; Graham et al., 2009; Vamosi et al., 2009). En cambio, comunidades estructuradas por filtrado ambiental, tendrán especies evolutivamente relacionadas, ya que en condiciones extremas son pocos los grupos que van a conseguir evolucionar y adaptarse (Cavender-Bares et al, 2004; Kembel & Hubbel, 2006; Graham et al., 2009). Un claro ejemplo de cómo el estudio de la diversidad genética puede ayudar a entender los determinantes ecológicos de la estructura de comunidades, es aquel realizado por Graham et al. (2009), quienes evaluaron la estructura filogenética de comunidades de colibrís a lo largo de gradientes ambientales. Sus resultados demostraron que a mayor altitud las comunidades se encuentran agregadas filogenéticamente, como consecuencia del filtrado ambiental, mientras que en sitios bajos y húmedos las comunidades no presentan estructura filogenética o muestran patrones de dispersión filogenética, a causa de la competencia. Hasta lo que conocemos, existen pocos estudios similares para comunidades de macroinvertebrados. Por ejemplo, Baker et al. (2004)

realizaron en Australia comparaciones cualitativas del nivel y patrones de estructuración genética dentro de géneros de macroinvertebrados con el objetivo de conservar áreas con alta biodiversidad. Otro estudio importante es el realizado por Pfenninger et al. (2007) quienes utilizaron código de barras genético (DNA barcoding) para inferir la estructura de comunidades de larvas de chironomidos (*Chironomus*). En regiones tropicales los estudios de este tema son aún más escasos (eg. Saito et al., 2016), y solo conocemos de un estudio que combina información genética con datos ambientales en cuencas glaciares tropicales (Finn et al., 2016). El presente trabajo pretende sortear esta brecha de conocimiento por medio del estudio filogenético de comunidades de insectos acuáticos en una cuenca glaciar. Esperamos encontrar patrones de agregación filogenética y baja riqueza de taxones en sitios influenciados por el glaciar, debido a que en condiciones hostiles son pocos los individuos que logran adaptarse; por otro lado, patrones de dispersión filogenética o comunidades sin estructura filogenética se esperaría en lugares con baja influencia glaciar, además de alta riqueza de taxones; la primera explicada por presencia de competencia y la segunda por procesos neutrales (dispersión).

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la estructura filogenética de comunidades de insectos acuáticos de río en una cuenca altoandina con influencia glaciar.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Construir una filogenia de taxones de insectos acuáticos mediante el análisis de secuencias mitocondriales (citocromo oxidasa COI).
- ✓ Analizar el nivel de parentesco dentro de 50 comunidades de insectos acuáticos y cómo este varía a lo largo de un gradiente de hostilidad ambiental.
- ✓ Contribuir a la comprensión acerca de factores – abióticos o bióticos – que determinan la estructuración de comunidades de insectos acuáticos de ríos altoandinos.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 ÁREA DE ESTUDIO

El presente estudio se llevó a cabo en las faldas occidentales del volcán Antisana, un estratovolcán de la era cuaternaria, cubierto de glaciares y, con una elevación de 5758 m s.n.m. (Bourdon et al., 2002). La historia eruptiva del Antisana es mayormente desconocida, aunque se sabe que la última erupción fue en 1801 y que actualmente se encuentra inactivo (Hall et al., 2008). Este volcán está ubicado en la cordillera oriental de los Andes en Ecuador (0 ° 28'S, 78 ° 09'W, 5760 m s.n.m.), 50 km al sureste de Quito, entre las provincias de Pichincha y Napo (Rivera Rossi, 2007). El área de estudio se caracteriza por su gran riqueza hídrica, con ríos, riachuelos, lagunas y humedales, muchos de los cuales proveen de agua a gran parte de Quito y sus alrededores (Rivera Rossi, 2007). Desde el 2008, el equipo de Ecología de Ríos de la PUCE ha realizado estudios y muestreos en 50 sitios del área (Fig. 2), gracias a los cuales existe gran cantidad de información taxonómica y funcional acerca de las comunidades de macroinvertebrados. Los riachuelos del área de estudio son cabeceras del Río Antisana, tributario del río Napo, importante afluente del río Amazonas (Jacobsen et al., 2010).

5.2 COLECCIÓN DE ESPECÍMENES

Para determinar la estructura filogenética de las comunidades de insectos acuáticos presentes en los 50 sitios del área de estudio (Fig. 2), primero debíamos construir un árbol filogenético con los géneros de insectos acuáticos del área. Los análisis del presente estudio se realizaron a nivel de género, debido a la dificultad para identificar a los individuos (la mayoría larvas) hasta el nivel de especie. Para obtener material para los análisis genéticos, y en base a la

información previa sobre la composición taxonómica de las comunidades de los 50 sitios (proveniente de estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación), seleccionamos cuatro sitios de muestreo (12, 44, 45 y 50, Fig. 2), caracterizados por poseer alta riqueza y abundancia de macroinvertebrados y por albergar a los taxones representativos de todos los demás sitios de estudio en el área. Cabe notar que en el árbol filogenético incluimos solo aquellos taxones que, según los datos de composición taxonómica de las comunidades, presentan abundancias relativas mayores al 1% (22 géneros), debido a la dificultad de encontrar y recolectar los taxones raros. En los cuatro sitios recolectamos los insectos mediante muestreos cualitativos con la ayuda de una red *D-net* (300 μ m de diámetro de malla), empleando el método *kick sampling*. Posteriormente, los especímenes fueron colocados en frascos de 250 ml con etanol al 96%. En el laboratorio, se limpiaron, separaron, contaron e identificaron las muestras hasta nivel de género y tipo, con la ayuda de claves taxonómicas especializadas (Domínguez & Fernández, 2009 y Roldán, 1996) y de un catálogo de fotos de especímenes del área, elaborado por el personal del Laboratorio de Limnología de la PUCE.

5.3 EXTRACCIÓN, PCR Y SECUENCIACIÓN DE ADN

En el Laboratorio de Biología Molecular de la PUCE, realizamos la extracción de ADN de los insectos acuáticos recolectados. Para esto, primero hidratamos a los individuos y separamos la parte anterior de la posterior mediante un corte transversal, para así evitar que sustancias contenidas en el intestino inhiban la PCR. A continuación, colocamos la parte anterior de cada larva en un tubo eppendorf (1,5ml) con 500 μ l de Buffer T.E 0,1X, y la dejamos reposar en refrigeración por un día o más si se consideraba necesario. Realizamos la extracción en base al Protocolo de extracción de ADN con CTAB (invertebrados), proporcionado por el

laboratorio de Biología Molecular (Anexo 2). A continuación, cuantificamos el ADN obtenido con la ayuda de un Nanodrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc).

A partir del ADN extraído, procedimos a amplificar un fragmento del gen mitocondrial citocromo oxidasa I (COI) por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Utilizamos únicamente el marcador mitocondrial COI, debido a que no se requiere un conocimiento previo de la secuencia mitocondrial de un taxón, ya que la ubicación de los genes de ADN mitocondrial (mtDNA) se encuentra relativamente conservada en una variedad de taxa; por lo tanto, múltiples cebadores pueden emplearse para amplificar porciones de mtDNA (Lin & Danforth, 2004; Freeland et al., 2011). Por otro lado, en insectos, se estima que los genes mitocondriales evolucionan 2-9 veces más rápido que los genes codificadores de proteínas, lo que los hace valiosos a la hora de realizar análisis filogenéticos (Lin & Danforth, 2004). Es por esto que varios autores (e.g. Finn et al., 2006; Schultheis & Hughes, 2005; Zickovich & Bohonak, 2007) han basado su trabajo en el uso de genes mitocondriales, obteniendo así información útil y relevante.

Los cebadores que empleamos fueron: Derecho LCO1490 (5'-GGTCAACAATCATAAAGATATTGG-3'), dgLCO1490 (5'-GGTCAACAATCATAAAGAYATYGG-3') y Reverso HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'), dgHCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGAC CAAAAAYCA-3') (Folmer et al., 1994; Meyer et al., 2005), pertenecientes a la marca InvitrogenTM, al igual que los reactivos utilizados para dicho procedimiento. Los protocolos empleados se muestran en la tabla 3. El volumen final de las reacciones fue de 25µl (18.25µl de H₂O, 2.5µl de Buffer PCR 5X, 1.5µl de MgCl₂ 50mM, 0.5µl de dNTPs 10mM, 0.5µl de cada cebador 10µM, 0.25µl de Taq polimerasa y 1 unidad de ADN). Realizamos la visualización de los productos de PCR en geles de agarosa al 1%. Con

ayuda del kit de purificación ExoSap-IT, eliminamos residuos de cebadores y de dNTPs mediante su hidrolización. Por último, enviamos los productos a la empresa Macrogen, en Corea (Macrogen In., Seoul, Korea) y a la Universidad de Texas, Austin (USA) para su respectivo secuenciamiento. Como no obtuvimos la secuencia para algunos de los géneros de nuestra área de estudio, obtuvimos secuencias de los mismos géneros de dos bases de datos relevantes: Genbank y BOLD.

5.4. ENSAMBLAJE, EDICIÓN Y ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS

Las secuencias obtenidas en el laboratorio, así como las de Genbank y BOLD, fueron ensambladas y alineadas con el programa Geneious Pro versión 10.0.8 (Kearse et al., 2012). Las secuencias consenso resultantes se alinearon con el mismo programa, mediante la extensión MAFFT Multiple Alignment con la configuración por defecto (Kato et al., 2002). Finalmente, con ayuda del programa Mesquite v3.04 (Maddison & Maddison, 2015) realizamos la última revisión y corrección manual de las secuencias, en caso de ser necesario.

5.5 ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

Para las particiones y los modelos de sustitución de nucleótidos, usamos el programa Partition Finder (Lanfear et al., 2012) y el Criterio Bayesiano de Información (BIC). Los modelos de sustitución fueron: SYM+I+G (Symmetrical model + sitios invariantes + distribución Gamma, GTR+I+G (Generalised time-reversible + sitios invariantes + distribución Gamma) para la segunda posición y HKY+G (Hasegawa-Kishino-Yano + distribución Gamma) para la tercera posición.

5.5.1 CONSTRUCCIÓN DEL ÁRBOL FILOGENÉTICO

Construimos un árbol ultramétrico (i.e. todos los nodos son equidistantes desde la raíz del árbol) con el programa BEAST v 1.8.4 (Drummond et al., 2012), pues el análisis requerido implicó calibración con tiempos de divergencia (Eguiarte et al., 2007). El archivo en formato XML, necesario para usar el programa BEAST, fue creado con el software BEAUti v. 1.8.4 (Drummond et al., 2007). Dentro de este archivo, especificamos parámetros como particiones, modelos de sustitución y grupos monofiléticos. En la opción Clocks, se seleccionó un reloj molecular relajado con distribución Lognormal (*Uncorrelated relaxed clock, Lognormal*), mientras que en la opción Priors se establecieron los tiempos de divergencia utilizados para el presente estudio (Misof et al., 2014, ver Anexo 2). Todos los análisis en BEAST se realizaron en los procesadores CIPRES Science Gateway (Miller et al., 2010). Posteriormente, los resultados fueron analizados en Tracer v1.4 (Rambaut & Drummond, 2007), para determinar la convergencia y el tamaño efectivo de la población (ESS). Con la ayuda de LogCombiner v1.8.4 (Drummond et al., 2012), combinamos los archivos, después de haber eliminado el 10% de los árboles resultantes. El árbol consenso (Maximun clade credibility tree) (MCCT) se generó a partir de 2500 árboles, en el programa TreeAnnotator v1.8.4 (Drummond et al., 2012). Finalmente, se visualizó y editó el árbol en Fig Tree v.1.4.3.

5.5.2 ESTRUCTURA FILOGNÉTICA

El árbol generado sirvió para determinar la estructura filogenética de las 50 comunidades del área de estudio. Para esto, se calculó el índice de relación neta (Net Relatedness Index, NRI) de cada comunidad, el cual captura el grado de agrupamiento de la filogenia desde la raíz hasta las hojas terminales. (Webb et al., 2002). Este índice fue desarrollado con el objetivo de revelar patrones no aleatorios en la estructura filogenética de la comunidad (Helmus et al.,

2007; Webb, 2000), como agregación o dispersión filogenética (Saito et al., 2016). El NRI se calcula mediante la siguiente fórmula: $NRI = -1 ((MPD_{obs} - MPD_{rnd})/MPD_{sd})$, donde MPD_{obs} es la media de la distancia filogenética de todos los pares de taxones en la comunidad estudiada, MPD_{rnd} es la media de la distancia filogenética de los datos obtenidos por el intercambio al azar de todos los terminales de la filogenia completa (con todos los taxones presentes en el área de estudio) y MPD_{sd} es la desviación estándar de MPD_{rnd} (Webb et al., 2008). Este análisis se llevó a cabo con el paquete Picante v. 1.6-2 (Kembel et al., 2010) del programa estadístico R v 3.4.0 (R Core Team 2015). Para evaluar la significación de los NRIs de cada comunidad, los comparamos con la distribución de NRIs de 999 comunidades generadas al azar (nulas). Así, valores positivos de NRI indican agrupación filogenética, donde los taxones coexistentes están más relacionados entre sí que lo esperado por azar, mientras que valores negativos muestran dispersión filogenética, donde los taxones coexistentes están menos relacionados entre sí que lo que se esperaría por azar (Pontarp et al., 2012).

En ecología, los modelos nulos han constituido una herramienta valiosa para dilucidar los mecanismos que generan patrones, como por ejemplo, la estructura de comunidades locales (Gotelli, 2000; Gotelli, 2001). El objetivo primordial de estos modelos es conocer si los patrones observados están influenciados por mecanismos ecológicos, evolutivos o simplemente, por el azar (Kembel & Hubbel, 2006; Gotelli, 2001). Para este estudio, utilizamos dos métodos para generar las comunidades nulas: 1) el modelo nulo de especies al azar, el cual, construye comunidades nulas manteniendo la riqueza y toma taxones al azar de la comunidad de estudio (Hardy, 2008; Kembel et al., 2010). 2) El modelo nulo de intercambio independiente (independent swap), genera matrices nuevas desde matrices de

presencia-ausencia de todo el pool de taxones empleando el algoritmo de intercambio independiente (Gotelli & Entsminger, 2003; Gotelli, 2000). Las comunidades nulas fueron generadas también con el paquete Picante de R. Los demás modelos disponibles en Picante no se utilizaron debido a que brindan información similar al modelo nulo de especies al azar (Kembel, 2009). Los resultados fueron considerados significativos a partir de $p = 0,05$ (Graham et al., 2009; Kembel et al., 2010).

5.6 VARIABLES AMBIENTALES

Para entender la relación entre las variables ambientales y la estructura filogenética de las comunidades de los 50 sitios de la REA, se relacionaron los valores de NRI con información de variables ambientales obtenida por Cauvy-Fraunié et al. (2015). Las variables utilizadas fueron: pendiente (cm/m), temperatura (°C), conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$), clorofila *a* (mg/m^2), ancho (cm), pH y turbidez (NTU). Además, utilizamos los valores del índice glaciario (IG) calculado por Cauvy-Fraunié et al. (2015), para caracterizar el nivel de hostilidad ambiental de cada sitio y entender si este se relaciona con la estructura (nivel de parentesco) de las comunidades.

5.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Realizamos un análisis de componentes principales (ACP), para determinar la relación entre los valores de NRI y los valores de las siete variables ambientales y dilucidar si comunidades que poseen estructura filogenética, se encuentran en hábitat similar, o por el contrario en nichos distintos (Graham et al., 2009). Estos análisis los llevamos a cabo en el programa R v 3.4.0 (R Core Team 2015).

6. RESULTADOS

6.1 ÁRBOL FILOGENÉTICO

La mayoría de los nodos dentro de la filogenia poseen un soporte alto (Fig 3). El grupo más basal pertenece al orden Ephemeroptera, género *Andesiops*, donde se distingue la presencia de más de una especie dentro de este género. Se puede notar, además, que se trata de la divergencia más basal con respecto al resto de grupos, 406,5 MA aproximadamente, seguido por el orden Plecoptera, Trichoptera, Coleoptera y finalmente, el de divergencia más reciente, Diptera.

6.2 ESTRUCTURA FILOGENÉTICA DE COMUNIDADES Y SU RELACIÓN CON VARIABLES AMBIENTALES

De las 50 comunidades de macroinvertebrados analizadas, 30 (60%) presentaron valores de NRI positivos, es decir, agregación filogenética, pero de éstas, 5 (17%) fueron significativas para un $p < 0.05$. Las comunidades restantes 20 (40%) mostraron valores de NRI negativos indicando dispersión filogenética o no estructura siendo no significativos para un $p > 0.05$.

Al visualizar la relación entre la estructuración filogenética y la riqueza de taxones de los 50 sitios de estudio (Fig. 5, modelo nulo de especies al azar y Fig. 6, modelo de intercambio independiente), encontramos que los sitios del primer cuadrante (esquina superior derecha, sitios 1, 2, 4, 5, 8 y 9), caracterizados por ubicarse cerca del glaciar, presentan una riqueza de taxones baja (2-19). De estos, los sitios 2, 4, 8, 9 presentan agrupamiento filogenético ($\text{NRI} > 1$ y $p < 0.05$). Por el contrario, el segundo y tercer cuadrante, que agrupan sitios más alejados del glaciar y/o con distintas fuentes de agua (vertiente, drenaje y mezclas), presentan valores

medios y altos de riqueza de taxones y valores de NRI que varían entre 0 y < -1 . Nótese que obtuvimos resultados similares para ambos modelos nulos.

Nuestros resultados sugieren que comunidades agrupadas filogenéticamente tienden a ocurrir más en sitios con condiciones ambientales hostiles (alto nivel de influencia glacial). El análisis de componentes principales (PCA) confirma este resultado. Los dos primeros componentes explican, aproximadamente, el 58% de la variación. Este análisis muestra, además, que las comunidades agregadas filogenéticamente tienden a encontrarse en sitios pequeños (poco anchos), con alta turbidez y baja temperatura, conductividad y concentración de clorofila. Se observa también que ambos componentes principales arrojaron autovalores mayores a 1 (Tabla 3).

7. DISCUSIÓN

7.1 RELACIONES FILOGENÉTICAS DE INSECTOS ACUÁTICOS PRESENTES EN EL ÁREA DE ESTUDIO.

La filogenia construida para los géneros presentes en el área de estudio mostró un soporte alto ($>0,95$) en la mayoría de nodos, mientras que ciertas relaciones filogenéticas no se encuentran completamente resueltas, ya que sus valores de soporte son bajos ($<0,70$). Sin embargo, consideramos que esto no afecta a los resultados obtenidos, debido a que el principal enfoque de este estudio es dilucidar cómo se encuentran estructuradas las comunidades de insectos acuáticos, más no un entendimiento profundo de las relaciones evolutivas entre los taxones.

7.2 ESTRUCTURA FILOGENÉTICA

Nuestros resultados muestran agregación filogenética significativa solo en cinco de los 50 sitios de estudio, los cuales muestran, además, altos niveles de hostilidad ambiental (i.e. índice de glaciación). En los demás sitios, en cambio, las comunidades presentan dispersión genética o ausencia de estructura. Otros estudios acerca de estructura genética a lo largo de gradientes de estrés han encontrado resultados variados. Por ejemplo, Cavender-Bares et al. (2004), en su estudio con comunidades de robles a lo largo de un gradiente altitudinal, encontraron que la dispersión filogenética domina a grandes altitudes, debido a la facilitación. Por otro lado, el estudio realizado por Graham et al. (2009), en colibríes revela, claramente, que comunidades ubicadas a mayores altitudes, en ambientes hostiles, presentan patrones de agregación, mientras que comunidades ubicadas en lugares bajos y poco hostiles muestran dispersión filogenética. Con respecto a insectos acuáticos, la información sobre la estructura genética las comunidades a lo largo de gradientes de hostilidad es muy escasa, pues la

mayoría de estudios se han enfocado en estudiar la composición de las comunidades a nivel taxonómico y funcional (Jacobsen et al., 2014a; Jacobsen & Dangles, 2012; Ilg & Castella, 2006; Crespo-Pérez et al., *en prep*).

Nuestros resultados indican claramente que solo los lugares más cercanos al glaciar presentan comunidades agregadas filogenéticamente (NRIs positivos y significativos), que, además, albergan un bajo número de taxones. Estudios previos sugieren que el IG constituye una fuente de estrés para las comunidades (Castella et al., 2001, Fureder 2007, Jacobsen et al., 2010, Jacobsen & Dangles, 2012), lo cual sugiere que el filtrado ambiental estaría influyendo al ensamblaje de las comunidades en estos sitios ambientalmente hostiles. Además, en un estudio sobre diversidad taxonómica en la misma área, Cauvy-Fraunié et al. (2015) encontraron que la influencia del glaciar y el aislamiento espacial de los ríos de cabecera, son importantes determinantes de la estructura de las comunidades locales. Se sabe que bajo la influencia del filtrado ambiental, las comunidades tienden a agregarse filogenéticamente (Cavender-Bares et al., 2004; Graham et al., 2009), debido a que la fuerte influencia del ambiente produce la coexistencia de especies genéticamente cercanas, que comparten caracteres que les permiten asentarse y sobrevivir bajo condiciones determinadas (Webb et al., 2002; Graham et al., 2009; Riedinger et al., 2012; Wang et al., 2012). De hecho, estudios de rasgos funcionales han demostrado que en ríos con alta influencia glaciar se filtran taxones con rasgos de resiliencia (capacidad de absorber perturbaciones y no alterar de manera significativa sus características de estructura y funcionalidad), así como de resistencia (capacidad de resistir la perturbación sin una pérdida apreciable de individuos), que les permiten soportar las condiciones hostiles impuestas por el glaciar (eg. Brown & Milner 2012, Füreder 2007, Ilg & Castella 2006). En nuestro caso, en los ríos agregados filogenéticamente

predominan taxones pertenecientes a los órdenes Trichoptera y Díptera (Hydrobiosidae: *Cailloma*, Empididae: *Chelifera*, Chironomidae: Diamesinae, Podonominae, Orthocladiinae, Simuliidae: *Simulium* y Muscidae: *Limnophora*). Según el estudio de Ibarra (2016), estos taxones presentan características como tamaño pequeño del cuerpo, no nadan, viven agarrados al sustrato y se alimentan principalmente filtrando materia orgánica fina (FPOM). Estos rasgos seguramente representan adaptaciones para vivir en ambientes con bajas temperaturas, alta turbidez, baja disponibilidad de materia orgánica gruesa y baja producción primaria. En estudios futuros, sería importante incluir también la variación del caudal como factor de estrés, debido a que estos ríos son muy inestables y sufren disturbios frecuentes e impredecibles causados por las crecidas diarias (Milner et al., 2001; Brown et al. 2003).

La competencia interespecífica figura en varios trabajos previos como el principal proceso ecológico que genera dispersión filogenética (Graham et al., 2009; Webb et al., 2002). Por ejemplo, los resultados de Graham et al. (2009) muestran que este es un factor predominante para la dispersión filogenética en comunidades de colibríes de zonas bajas. En nuestro caso. encontramos que ciertos órdenes y familias (Trichoptera: Limnephilidae, Díptera: Limoniidae, Coleóptera: Elmidae, Díptera: Simuliidae, Plecóptera: Gripopterygidae, entre otros), caracterizados por ser competidores, se encuentran presentes y son abundantes. Para el caso específico de *Anomalocosmoecus*, el trabajo realizado por Dangles et al. (2011) lo reconoce como un competidor fuerte, debido a su presencia y dominancia en sitios sin influencia glaciar. Estudios como el de Ilg & Castella (2006) sugieren que son ciertos rasgos (p.eg tamaño pequeño, historias de vida univoltinas y semivoltinas, capacidad de refugiarse en el sustrato) los que les permiten a los insectos habitar ambientes más estables, expulsando así a los taxones menos competitivos. Habríamos esperado resultados relacionados con

comunidades dispersas filogenéticamente, debido a la presencia de estos competidores, pero creemos que otros mecanismos podrían estar influyendo en el ensamblaje de comunidades de nuestra área de estudio

La falta de estructuración filogenética sugiere que procesos neutrales (como la dispersión) rigen el ensamblaje de las comunidades (Kembel & Hubbell 2006). Según la teoría de metacomunidades (Liebold et al., 2004), altos niveles de dispersión pueden llegar a diluir el efecto de factores determinísticos como filtrado ambiental o interacciones bióticas. Dentro de nuestra área de estudio, la dispersión se relaciona con la cercanía que existe entre los sitios, lo que facilita el movimiento de los individuos entre un sitio y otro pero también con los rasgos funcionales. Existen taxones que poseen características morfológicas como alas (Heino, 2013), que les ayudan a desplazarse, cuerpos más hidrodinámicos que les permiten nadar activamente dentro de los ríos (Rawer-Jost et al., 1999); características que les hace más aptos para dispersarse, y por el contrario otros taxones que pasan toda su vida dentro del agua y se desplazan caminando, pero debido a que el área de estudio es pequeña y los sitios se encuentran conectados entre sí, su dispersión se da también mediante la corriente que los lleva río abajo. Cabe notar, además, que otros procesos que no han sido tomados en cuenta en este estudio, como interacciones dependientes de la densidad o facilitación durante la sucesión, podrían influenciar también la estructuración de las comunidades (Cavender-Bares et al., 2009). Finalmente, Helmus (2007) propone que tanto el filtrado ambiental como la competencia pueden ocurrir simultáneamente y oscurecer así el efecto de ambos sobre la estructuración filogenética de las comunidades.

Es importante realizar esfuerzos orientados a secuenciar más taxones, con el objetivo de obtener más información acerca de las relaciones filogenéticas. Por otro lado, el uso de otras

técnicas moleculares como RAD-Seq, a nivel de poblaciones, nos brindaría información útil para entender mejor las diferencias genéticas entre poblaciones de una misma especie. Estudios basados en diversidad filogenética beta o recambio filogenético nos ayudarían a complementar los estudios de ensamblaje y estructura filogenética de comunidades realizados, debido a que analizan el cambio en la estructura filogenética entre comunidades, lo que permite, además, conectar procesos como filtrado ambiental e interacciones bióticas con características funcionales, proporcionando información valiosa (Graham & Fine 2008).

8. CONCLUSIONES

- Las comunidades de macroinvertebrados en ríos de las faldas occidentales del volcán Antisana muestran agregación filogenética significativa solo en sitios con altos niveles de influencia glacial. Esto podría explicarse por medio de la hipótesis del filtrado ambiental.
- Existen variables ambientales que influyen negativamente (temperatura, conductividad, clorofila *a*) mientras que la turbidez lo hace de manera positiva a comunidades agregadas filogenéticamente.
- La mayoría de sitios del área de estudio muestran ausencia de estructura genética. Esto podría explicarse por procesos neutrales (dispersión) que actúan sobre el ensamblaje de comunidades

9. LITERATURA CITADA

1. Baker, A., Hughes, J., Dean, J., Bunn, S. 2004. Mitochondrial DNA reveals phylogenetic structuring and cryptic diversity in Australian freshwater macroinvertebrate assemblages. *Marine and Freshwater Research* 55(6) 629–640.
2. Bourdon, E., Eissen J.-P., Monzier, M., Robin, C., Martin, H., Cotton, J & Hall, M.L. 2002. Adakite-like lavas from Antisana volcano (Ecuador): evidence for spalmelt metasomatism beneath the Andean northern volcanic zone. *Journal of Petrology*, 43, 199–217.
3. Brown, L., D. Hannah, & A. Milner. 2003. Alpine stream habitat classification: an alternative approach incorporating the role of dynamic water source contributions. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research* 35:313-322.
4. Brown, L. E & Milner, A. M. 2012. Rapid loss of glacial ice reveals stream community assembly processes. *Global Change Biology* 18(7): 2195-2204.
5. Cáceres, B., Maisincho, L., Manciat, C., Loyo, C., Cuenca, E., Villacís, M., Freire, D., Francou, B & Cadier, E. 2008. Glaciares del Ecuador Antisana y Carihuayrazo, balance de masa, topografía, meteorología & hidrología. Informe del Año 2006. IRD, EMAAP-Q, INAMHI Quito.
6. Carew, M. E., Nichols, S. J., Batovska, J., St Clair, R., St., Murphy, N. P., Blacket, M. J., & Shackleton, M. E. 2017. A DNA barcode database of Australia's freshwater macroinvertebrate fauna. *Marine and Freshwater Research* 68, 1788-1802.
7. Castella, E., Adalsteinsson, H., Brittain, J.E., Gislason, G.M., Lehmann, A., Lencioni, V., Lods-Crozet, B., Maiolini, B., Milner, A.M., Olafsson, J.O., Saltveit, S.J. & Snook, D.L.

2001. Macrobenthic invertebrate richness and composition along a latitudinal gradient of European glacier-fed streams. *Freshwater Biology* 46:1811–1831.
8. Cavender-Bares, J., Ackerly, D., Baum, D., Bazzaz, F. 2004. Phylogenetic overdispersion in floridian oak communities. *The American Naturalist* 163:823–843.
9. Cavender-Bares, J., Kozak, K., Fine, P., Kembel, S. 2009. The merging of community ecology and phylogenetic biology. *Ecology Letters* 12: 693–715.
10. Cauvy-Fraunié, S., Espinosa, R., Andino, P., Dangles, O. & Jacobsen, D. 2014. Relationships between stream macroinvertebrate communities and new flood-based indices of glacial influence. *Freshwater Biology* 59:1916–1925.
11. Cauvy-Farunié, S. 2014. Hydro-écologie des communautés d’invertébrés aquatiques dans les rivières glaciaires équatoriennes (tesis de doctorado). Université Pierre et Marie Curie, París, Francia.
12. Cauvy-Fraunié, S., Espinosa, R., Andino, P., Jacobsen, D., Dangles, O. 2015. Invertebrate Metacommunity Structure and Dynamics in an Andean Glacial Stream Network Facing Climate Change. *PLoS One*. 10(8): e0136793.
13. Cauvy-Fraunié, S., Andino, P., Espinosa, R., Calvez, R., Jacobsen, D., & Dangles, O. 2016. Ecological responses to experimental glacier-runoff reduction in alpine rivers. *Nature Communications*, 7.
14. Conogasi, E. 2015. Introducción a la filogenética. Conogasi.org. Recuperado de: <http://conogasi.org/articulos/introduccion-a-la-filogenetica/>
15. Chase, J. M. 2007. Drought mediates the importance of stochastic community assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104:17430-17434.
16. Dangles, O., Crespo-Pérez, V., Andino, P., Espinosa, R., Calvez, R & Jacobsen, D. 2011. Predicting richness effects on ecosystem function in natural communities: insights from high-elevation streams. *Ecology* 92(3), pp. 733–743.

17. Domínguez, E., & Fernández, H. 2009. Macroinvertebrados bentónicos Sudamericanos (Primera ed.). Tucumán-Argentina.
18. Drummond, A.J., Ho, S.Y.W., Rawlence, N., Rambaut, A. 2007. A rough guide to Beast 1.4. User's manual
19. Drummond AJ, Suchard MA, Xie D & Rambaut A. 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7 *Molecular Biology and Evolution* 29: 1969-1973.
20. Eguiarte, L., Souza, V. & Aguirre, X. 2007. Ecología Molecular. Instituto Nacional de Ecología. Mexico D.F.
21. Espinosa, R. 2014. Diversity patterns of aquatic macroinvertebrates across stream types and glacial influence in a tropical high-Andean catchment (tesis de posgrado). Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.
22. Finn, D.S., Theobald, D., Black, W., Poff, L. 2006. Spatial population genetic structure and limited dispersal in a Rocky Mountain alpine stream insect. *Molecular Ecology* 15, 3553–3566.
23. Finn, D. S., Encalada, A. C. & Hampel, H. 2016. Genetic isolation among mountains but not between stream types in a tropical high-altitude mayfly. *Freshwater Biology*, 61: 702–714.
24. Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., & Vrijenhoek, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3:294–299.
25. Francou, B., Cáceres, B., Villacís, M., Basantes, R., Maisincho, L., Galárraga, R., Romero, J. 2011. Analizando el cambio climático a partir de los glaciares del Ecuador. IRD, SENESCYT, EPMAPS, INAMHI, EPN, Imprenta Imprimax, Quito, Ecuador.

26. Francou, B. 2013. El rápido retroceso de los glaciares en los Andes tropicales: Un desafío para el estudio de la dinámica de los ecosistemas de alta montaña. *Ecología en Bolivia* 48(2): 69-71.
27. Francou, B., Ramirez, E., Cáceres, B., Mendoza, J. 2000. Glacier Evolution in the Tropical Andes during the Last Decades of the 20th Century: Chacaltaya, Bolivia, and Antizana, Ecuador. *Ambio* 29(7): 416-422.
28. Freeland, J. R., Kirk, H., Petersen, S.D. 2011. *Molecular Ecology*, West Sussex, United Kingdom: John Wiley and Sons.
29. Füreder, L. 2007. Life at the Edge: Habitat Condition and Bottom Fauna of Alpine Running Waters. *International Review of Hydrobiology* 92(4-5): 491-513.
30. Graham, C & Fine, P. 2008. Phylogenetic beta diversity: linking ecological and evolutionary processes across space in time. *Ecology Letters* 11: 1265-1277.
31. Graham, C.H., Parra, J., Rahbek, C., Maguire, J. 2009. Phylogenetic structure in tropical hummingbird communities. *Proceedings of the National Academy of Science* 106: 19673–19678.
32. Gotelli, N.J. 2000. Null model analyses of species co-occurrence patterns. *Ecology* 81: 2606–2621.
33. Gotelli, N. J. 2001. Research frontiers in null model analysis. *Global Ecology and Biogeography Letters* 10:337–343.
34. Gotelli, N. J. & Entsminger, G. 2003. Swap algorithms in null model analysis. *Ecology* 84(2):532-535.

35. Hall, M. L., P. Samaniego, J. L. Le Pennec, and J. B. Johnson 2008. Ecuadorian Andes volcanism: a review of the late Pliocene to present activity. *Journal of Volcanology and Geothermal Research* 176:1–6.
36. Hanson, P., Springer, M & Ramirez, A. 2010. Introducción a los grupos de macroinvertebrados acuáticos. *Revista de Biología Tropical* Vol. 58: 3-37.
37. Hardy, O.2008. Testing the spatial phylogenetic structure of local communities: statistical performances of different null models and test statistics on a locally neutral community. *Journal of Ecology* 96: 914 –926.
38. Hauer, F.R & Resh, V.H. 2017. *Methods in Stream Ecology*. Volume 1 (Third Edition) Academic Press, Boston.
39. Heino J. (2013) Environmental heterogeneity, dispersal mode, and co-occurrence in stream macroinvertebrates. *Ecology and Evolution* 3, 344–355.
40. Helmus, M.R., Bland, T.J., Williams, C.K., Ives, A.R. 2007. Phylogenetic measures of diversity. *The American Naturalist* 169: 68–83.
41. Ilg, C & Castella, E. 2006. Patterns of macroinvertebrates traits along three glacial stream continuums. *Freshwater Biology*, 51: 840–853.
42. Jacobsen D., Dangles O., Andino P., Espinosa R., Hamerlík L. & Cadier E. 2010. Longitudinal zonation of macroinvertebrates in an Ecuadorian glacier-fed stream: do tropical glacial systems fit the temperate model? *Freshwater Biology*, 55, 1234-1248.
43. Jacobsen, D. & Dangles, O. 2012. Environmental harshness and global richness patterns in glacier-fed streams. *Global Ecology and Biogeography* 21:647-656.

44. Jacobsen D, Andino P, Calvez R, Cauvy-Fraunié S, Espinosa R, Dangles O. 2014a
Temporal variability in discharge and benthic macroinvertebrate assemblages in a tropical
glacier-fed stream. *Freshwater Science* 33:32–45.
45. Jacobsen, D., & Dangles, O. 2017. *Ecology of high altitude waters*. First edition. Oxford
University Press.
46. Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., Miyata T. 2002. MAFFT: a novel method for rapid
multiple sequence alignment based on fast fourier transform. *Nucleic Acids Research* 30:
3059–3066.
47. Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S.,
Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Mentjies, P., & Drummond,
A. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the
organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647-1649.
48. Kembel, S. & Hubbel, S. 2006. The phylogenetic structure of a neotropical forest tree
community. *Ecology* 87: 86–99.
49. Kembel, S. 2009. Disentangling niche and neutral influences on community assembly:
assessing the performance of community phylogenetic structure tests. *Ecology Letters* 12:
949–960.
50. Kembel, S., Cowan, P., Helmus, M., Cornwell, W., Morlon, H., Ackerly, D., Blomberg,
S., & Webb, C. 2010. Picante: R tools for integrating phylogenies and ecology.
Bioinformatics 26:1463-1464.
51. Lanfear, R., Calcott, B., Ho, S.Y.W., Guindon, S. 2012. Partition Finder: combined
selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses.
Molecular Biology Evolution 29, 1695–1701.
52. Leibold, M. A., Holyoak, M., Mouquet, N., Amarasekare, P., Chase, J. M., Hoopes, M. F.,
Holt, R. D., Shurin, J. B., Law, R., Tilman, D., Loreau, M & Gonzalez, A. The

- metacommunity concept: a framework for multi-scale community ecology. *Ecology Letters* 7: 601–613.
53. Lemey, P., Salemi, M & Vandamme, A.M. 2009. *The Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing*. USA, New York. Cambridge University Press.
- Lin, C.P., & Danforth, B. 2004. How do insect nuclear and mitochondrial gene substitution patterns differ? Insights from Bayesian analyses of combined datasets. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 30: 686–702.
54. Maddison, W.P., & Maddison, D.R. 2015. *Mesquite: a modular system for evolutionary analysis*. Version 3.04. <http://mesquiteproject.org>.
55. Madsen P.B., Morabowen A., Andino P., Espinosa R., Cauvy-Fraunié S., Dangles O. & Jacobsen D. 2015 Altitudinal distribution limits of aquatic macroinvertebrates: an experimental test in a tropical alpine stream. *Ecological Entomology*, 40, 629-638
56. McPeck, M.A., & Miller, T.E. 1996. Evolutionary biology and community ecology. *Ecology* 77: 1319-1320.
57. Meyer CP, Geller JB, Paulay G. 2005. Fine scale endemism on coral reefs: Archipelagic differentiation in turbinid gastropods. *Evolution*, 59, 113–125.
58. Milner, A. M., J. E. Brittain, E. Castella, and G. E. Petts. 2001. Trends of macroinvertebrate community structure in glacier-fed rivers in relation to environmental conditions: a synthesis. *Freshwater Biology* 46:1833-1847.
59. Milner A.M. & Petts, G.E. 1994. Glacial rivers: physical habitat and ecology. *Freshwater Biology*, 32, 295–307.

60. Miller, M., Pfeiffer, W., Schwartz, T., 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for 1100 inference of large phylogenetic trees, in: Gateway Computing Environments 1101 Workshop (GCE). IEEE. pp. 1–8.
61. Misof B, Liu S, Meusemann K, Peters RS, Donath A, Mayer C, Frandsen PB, Ware J, Flouri T, Beutel RG, Niehuis O, Petersen M, Izquierdo-Carrasco F, Wappler T, Rust J, Aberer AJ, Aspöck U, Aspöck H, Bartel D, Blanke A, Berger S, Böhm A, Buckley TR, Calcott B, Chen J, Friedrich F, Fukui M, Fujita M, Greve C, Grobe P, Gu S, Huang Y, Jermini LS, Kawahara AY, Krogmann L, Kubiak M, Lanfear R, Letsch H, Li Y, Li Z, Li J, Lu H, Machida R, Mashimo Y, Kapli P, McKenna DD, Meng G, Nakagaki Y, Navarrete-Heredia JL, Ott M, Ou Y, Pass G, Podsiadlowski L, Pohl H, von Reumont BM, Schütte K, Sekiya K, Shimizu S, Slipinski A, Stamatakis A, Song W, Su X, Szucsich NU, Tan M, Tan X, Tang M, Tang J, Timelthaler G, Tomizuka S, Trautwein M, Tong X, Uchifune T, Walz MG, Wiegmann BM, Wilbrandt J, Wipfler B, Wong TK, Wu Q, Wu G, Xie Y, Yang S, Yang Q, Yeates DK, Yoshizawa K, Zhang Q, Zhang R, Zhang W, Zhang Y, Zhao J, Zhou C, Zhou L, Ziesmann T, Zou S, Li Y, Xu X, Zhang Y, Yang H, Wang J, Wang J, Kjer KM, Zhou X. 2014. Phylogenomics resolves the timing and pattern of insect evolution. *Science* 346(6210) 763-767.
62. Mohmad, A. H., Shafie, M. S. I., Hui, A. W. B., & Harun, S. (2015). The Aquatic Insect Communities of Universiti Malaysia Sabah (UMS), Sabah, Malaysia. *Journal of Tropical Resources and Sustainable Science*, 3, 1-5.
63. National Center for Biotechnology Information, NCBI. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>>, acceso Septiembre, 2016.

64. National Snow and Ice Data Center. (s.f.). All About Glaciers. National Snow and Ice Data Center. Recuperado de <https://nsidc.org/cryosphere/glaciers/quickfacts.html>.
65. Pfenninger, M., Nowak, C., Kley, C., Steinke, D., & Streit, B. 2007. Utility of DNA taxonomy and barcoding for the inference of larval community structure in morphologically cryptic Chironomus (Diptera) species.
66. Pontarp, M., Canbäck, B., Tunlid, A & Lundberg, P. 2012. Phylogenetic Analysis Suggests That Habitat Filtering Is Structuring Marine Bacterial Communities Across the Globe. *Microbial Ecology* 64(1): 8–17.
67. Qian, H. 2017. Climatic correlates of phylogenetic relatedness of woody angiosperms in forest communities along a tropical elevational gradient in South America. *Journal of Plant Ecology*, rtx006.
68. Quenta, E., Molina-Rodriguez, J., Gonzales, K., Rebaudo, F., Casas, J., Jacobsen, D & Dangles, O. 2016. Direct and indirect effects of glaciers on aquatic biodiversity in high Andean peatlands. *Global Change Biology* 22(9):3196-205.
69. Rawer-Jost, C., Kappus, B., Böhmer, J., Jansen, W & Rahmann, H. 1999. Upstream movements of benthic macroinvertebrates in two different types of fishways in southwestern Germany. *Hydrobiologia* 391: 47–61.
70. R Core Team. 2015. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
71. Rambaut, A., Drummond, A.J. 2007. Tracer. Version 1.4.2 <<http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>>.
72. Riedinger, V., Müllerb, J., Stadlerd, J., Ulriche, W & Brandlf, R. 2012. Assemblages of bats are phylogenetically clustered on a regional scale. *Basic and Applied Ecology* 14: 74-80.

73. Rivera Rossi J. 2007. Reserva Ecológica Antisana. In: Guía del Patrimonio de Áreas Naturales Protegidas del Ecuador. (Ed F. Ecofund, Darwinnet, Igm), Quito.
74. Roldán, G. 1996. Guía para el estudio de macroinvertebrados del departamento de Antioquia Universidad de Antioquia (Primera ed.). Bogotá-Colombia. Universidad de Antioquia.
75. Roldán-Pérez, G. 2016. Los macroinvertebrados como bioindicadores de la calidad del agua: cuatro décadas de desarrollo en Colombia y Latinoamérica. *Revista Académica Colombiana. Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* 40(155): 254-274.
76. Saito, V., Cianciaruso, M.V., Siqueira, T., Fonseca-Gessner, A.A & Pavoine, S. 2016. Phylogenies and traits provide distinct insights about the historical and contemporary assembly of aquatic insect communities. *Ecology and Evolution* 6(9): 2925–2937.
77. Schultheis, A & Hughes, J. 2005. Spatial patterns of genetic structure among populations of a stone-cased caddis (Trichoptera: Tasimiidae) in south-east Queensland, Australia. *Freshwater Biology* 50, 2002–2010.
78. Vamosi, S.M., Heard, S.B., Webb, C.O. 2009. Emerging patterns in the comparative analysis of phylogenetic community structure. *Molecular Ecology* 18:572– 592.
79. Wang, J., Soininen, J., He, J & Shen, J. 2012. Phylogenetic clustering increases with elevation for microbes. *Environmental Microbiology Reports* 4(2), 217–226.
80. Webb, C. 2000. Exploring the phylogenetic structure of ecological communities: an example for rain forest trees. *The American Naturalist* 156: 145–155.
81. Webb, C., Ackerly, D., McPeck, M., Donoghue, M. 2002. Phylogenies and community ecology. *Annual Review of Ecology and Systematics* 33: 475–505.

82. Webb, C. O., Ackerly, D. D., and Kembel, S. W. 2008. Phylocom: software for the analysis of phylogenetic community structure and character evolution. *Bioinformatics* 24:2098-2100.
83. Zickovich, J & Bohonak, A. 2007. Dispersal ability and genetic structure in aquatic invertebrates: a comparative study in southern California streams and reservoirs. *Freshwater Biology* 52, 1982–1996.

10. FIGURAS



Figura 1. Fotografía de una zona del área de estudio, donde se observa un río con influencia glacial (izquierda), otro de vertiente (derecha), y el río mixto que se forma por la confluencia de los otros dos (parte inferior). Foto por Oliver Dangles.

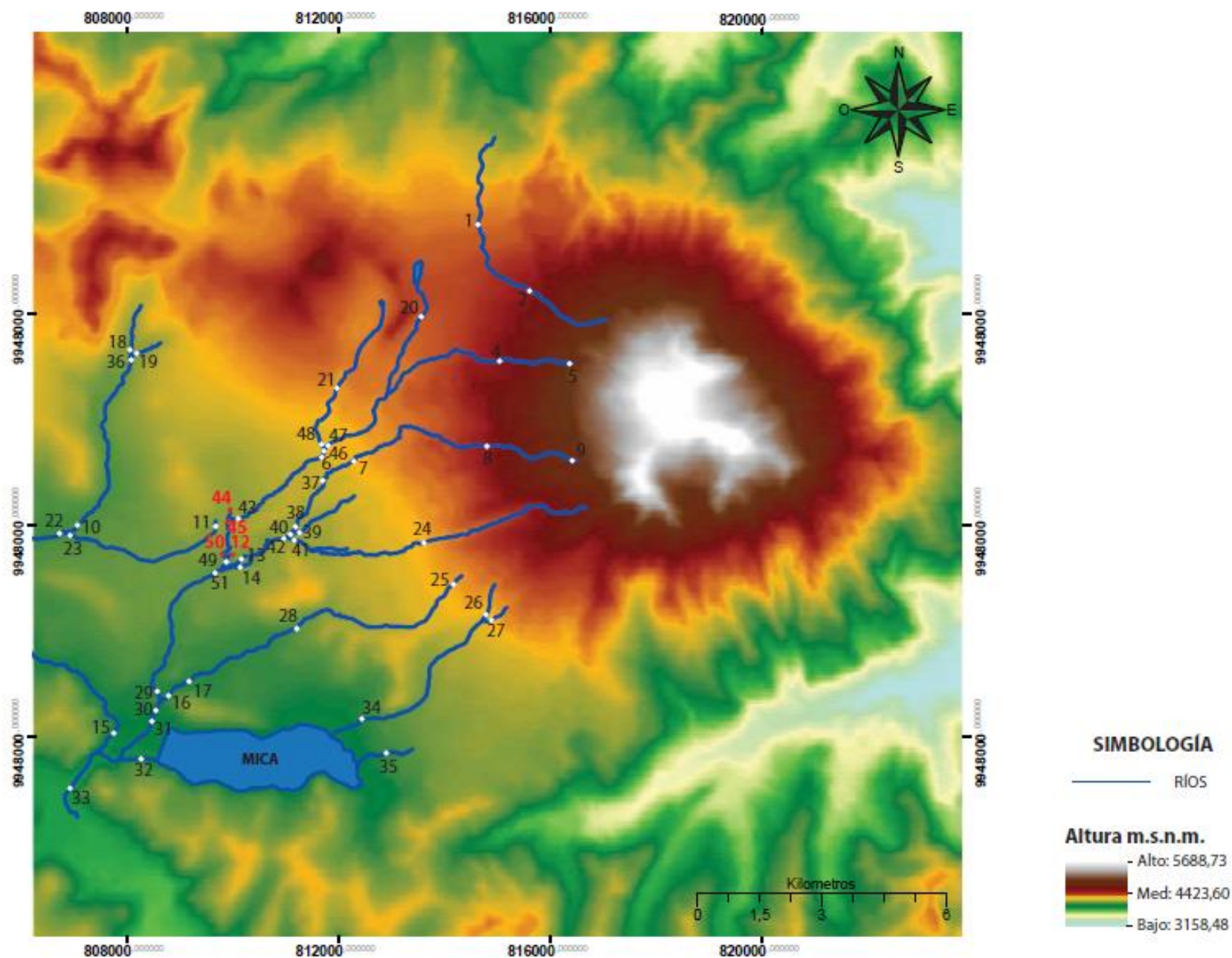


Figura 2. Mapa del área de estudio donde se muestran los 50 sitios de estudio. Se detallan en rojo los ríos (12, 44, 45 y 50) donde se realizó la colecta de insectos acuáticos para el secuenciamiento de COI.

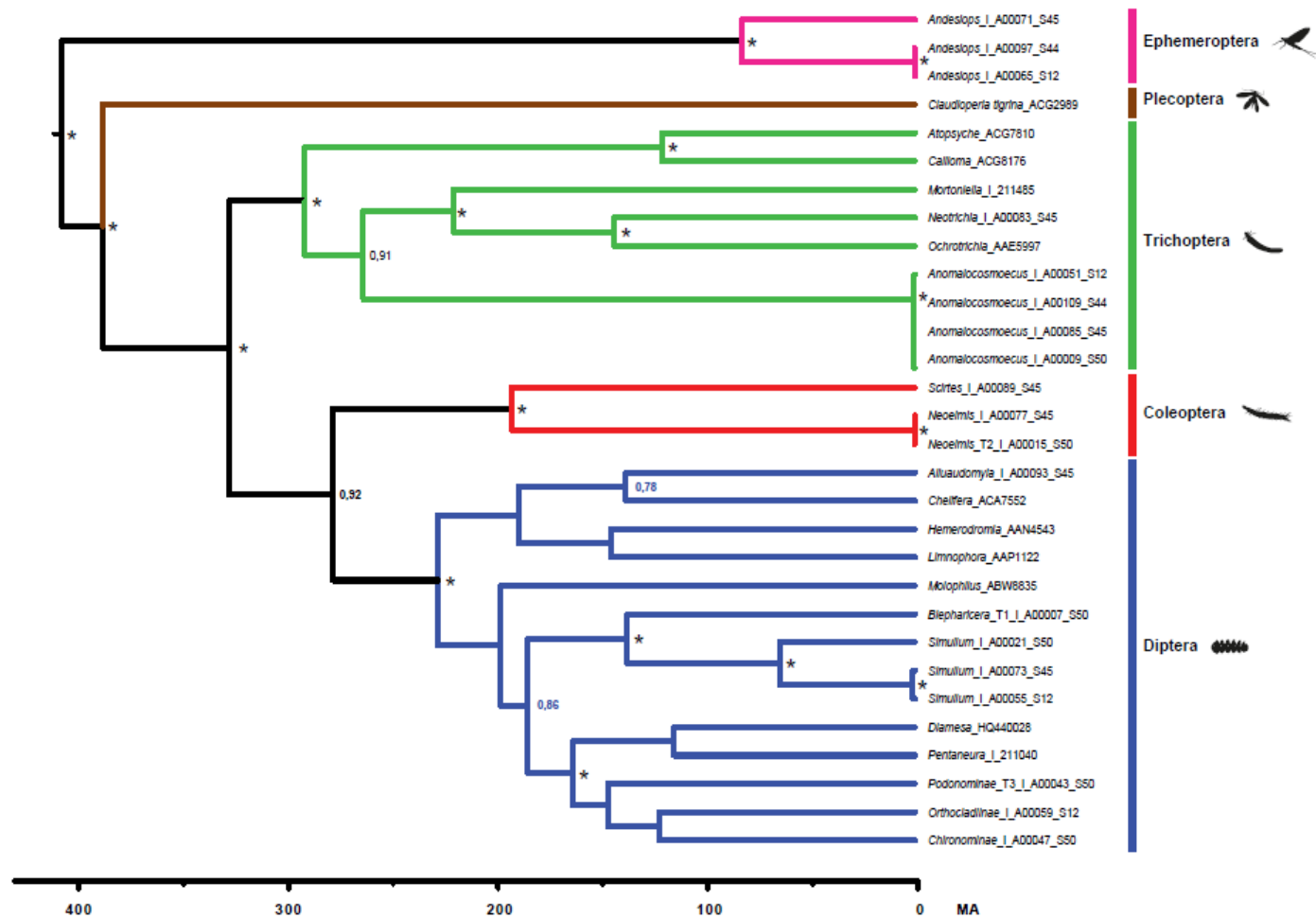


Figura 3. Árbol ultramétrico resultante de secuencias del gen mitocondrial (COI). Las terminales llevan el número de acceso de BOLD, Genbank o el código de campo. Con colores se detallan los diferentes órdenes de macroinvertebrados presentes en el árbol. Valores de soporte >0,95 se muestran con un *, mientras que valores < 0,70 no se muestran.

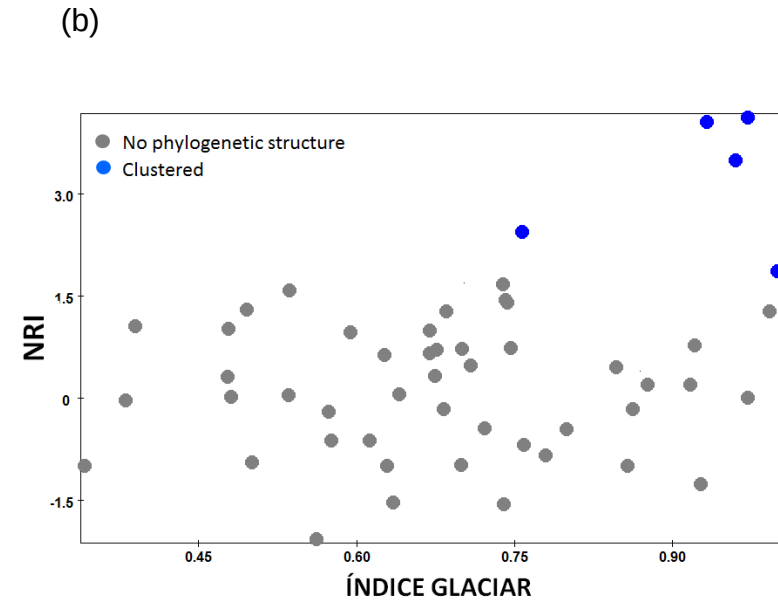
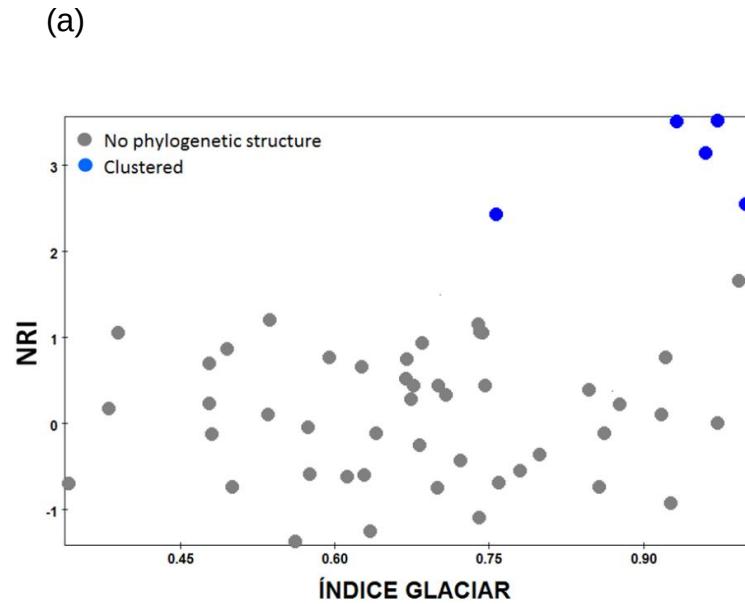


Figura 4. Gráficos que relacionan el índice glaciar y el índice de relación neta NRI según: (a) el modelo nulo de especies al azar y (b) el modelo nulo de intercambio independiente. Los círculos representan los 50 sitios de estudio y en colores se observa si las comunidades se encuentran emparentadas o no presentan estructura filogenética.

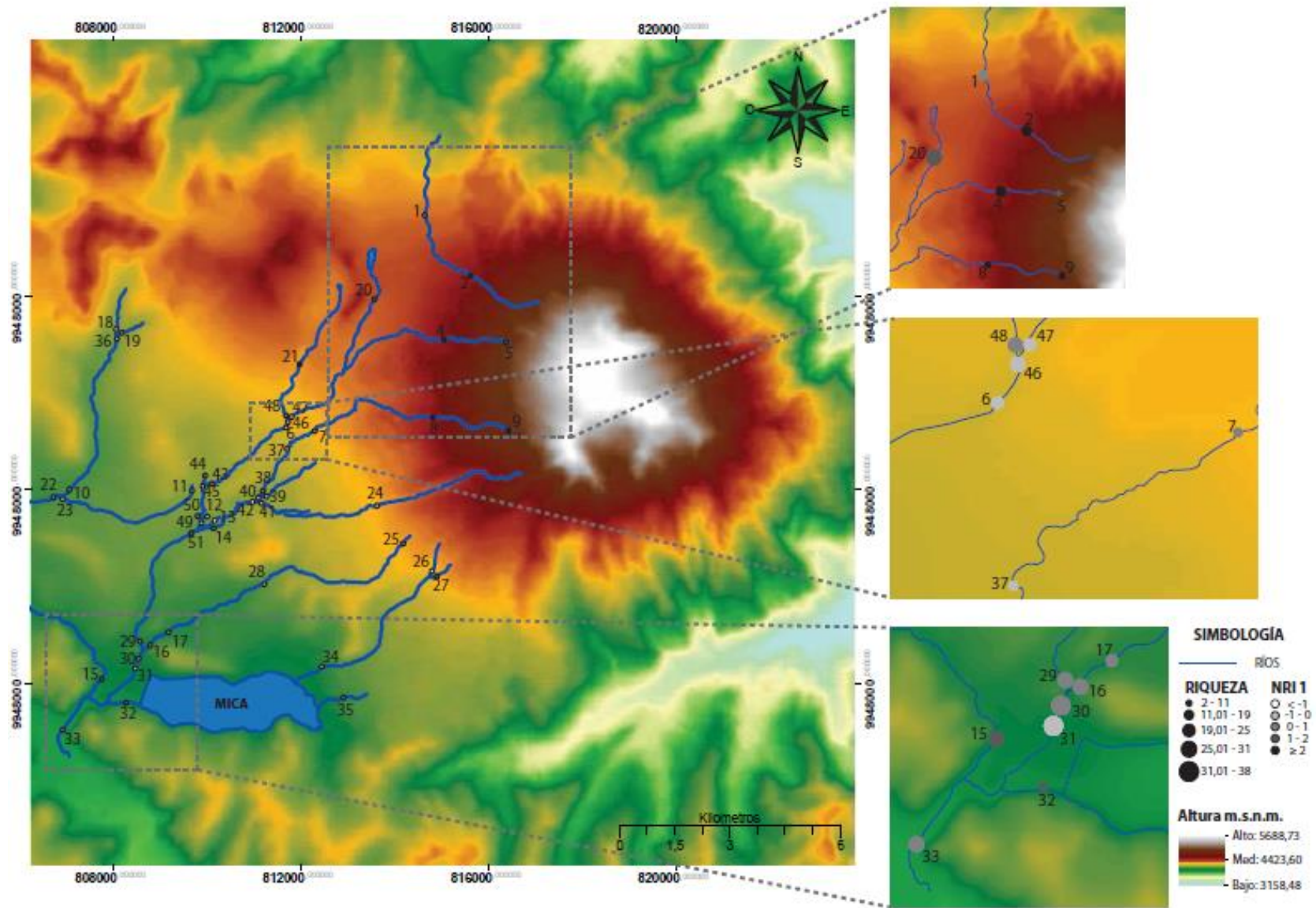


Figura 5. Mapa del área de estudio donde se muestran los 50 sitios y sus respectivos NRIs (calculados a partir del modelo nulo de especies al azar). El tamaño de los círculos refleja la riqueza de especies en cada lugar, mientras que el color indica los valores de NRI.

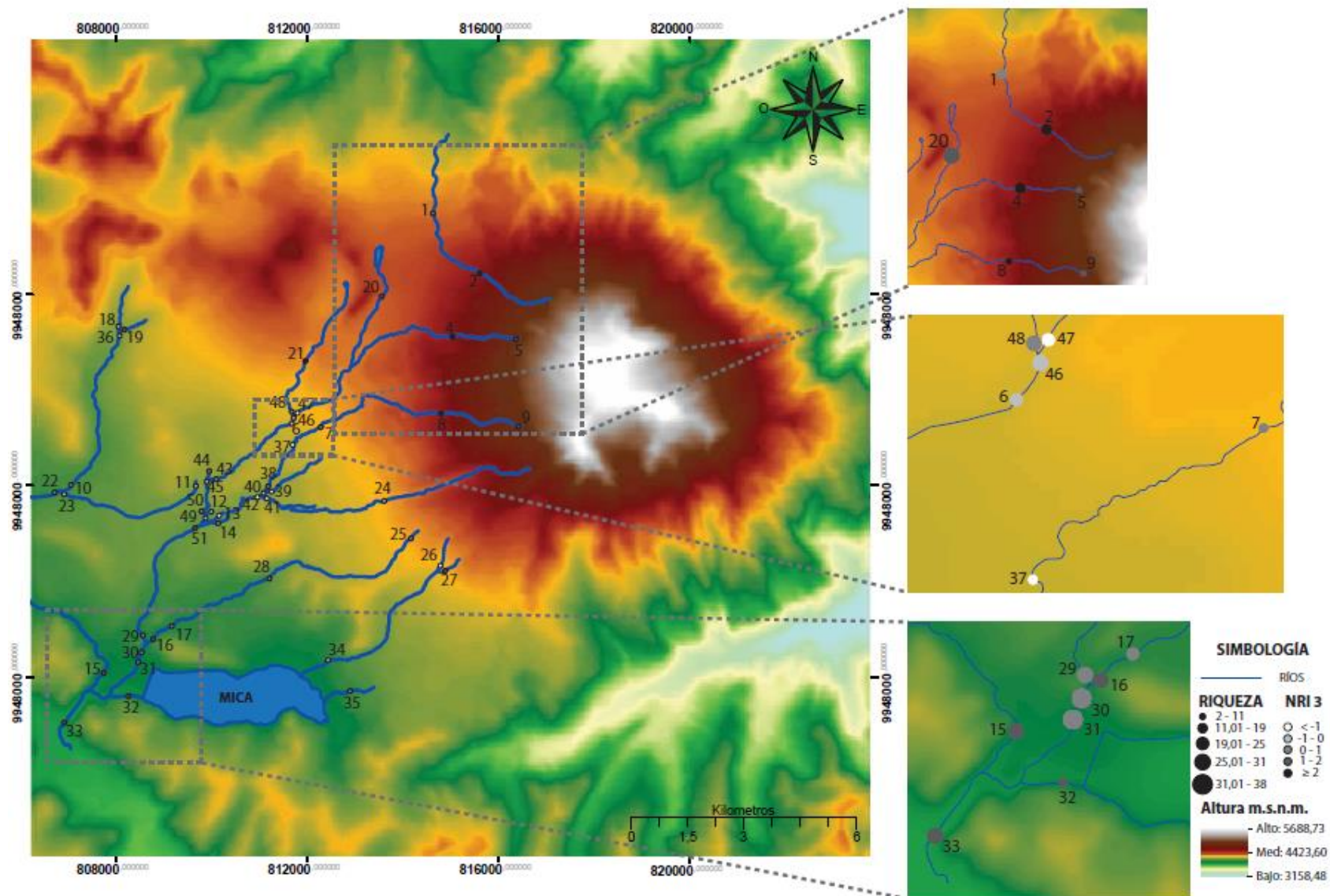
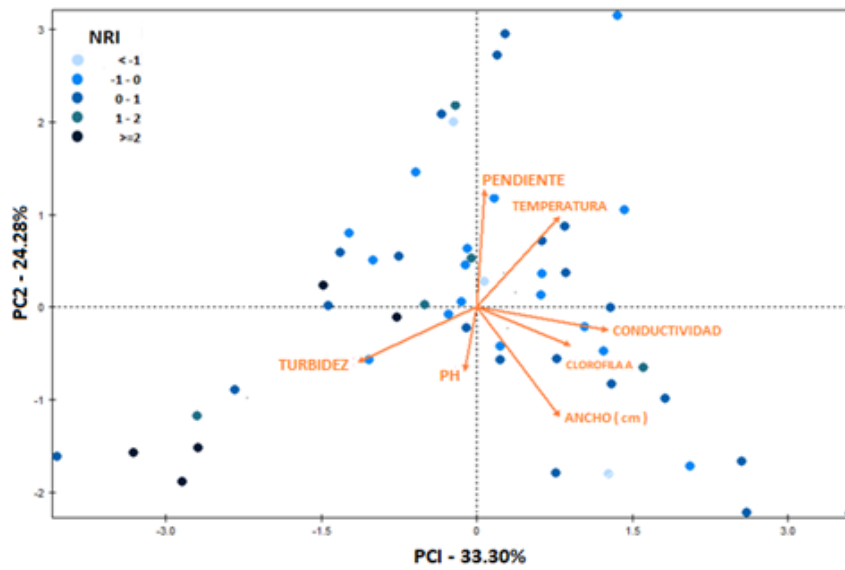


Figura 6. Mapa del área de estudio donde se muestran los 50 sitios y sus respectivos NRIs (calculados a partir del modelo nulo de intercambio independiente). El tamaño de los círculos refleja la riqueza de especies en cada lugar, mientras que el color indica los valores de NRI.

(a)



(b)

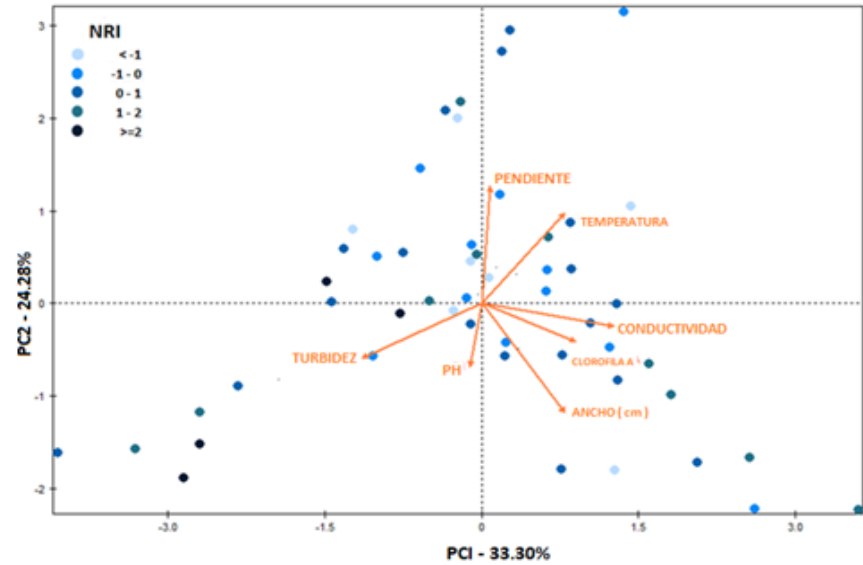


Figura 7. Análisis de componentes principales (ACP) que muestra la relación entre las variables y (a) los NRI's de cada sitio obtenidos a partir del modelo nulo de especies al azar y (b) los NRI's de cada sitio obtenidos a partir del modelo nulo de intercambio independiente.

11. TABLAS

Tabla 1. Especímenes y secuencias obtenidas en el Laboratorio de Biología Molecular, GenBank y BOLD utilizados en el presente estudio.

Especimen	Código	Sitio	Fuente
<i>Andesiops</i>	I_00065	S12	Presente Estudio
<i>Andesiops</i>	I_00097	S44	Presente Estudio
<i>Andesiops</i>	I_00071	S45	Presente Estudio
<i>Cailloma</i>	-	-	BOLD ID secuencia: EVTEC1207_13
<i>Atopsyche</i>	-	-	BOLD ID secuencia EVTEC1261_13
<i>Mortoniella</i>	I_211485	-	Yacuri
<i>Ochrotrichia</i>	-	-	BOLD ID secuencia:CFWIA098_10
<i>Neotrichia</i>	I_A00083	S45	Presente Estudio
<i>Anomalocosmoecus</i>	I_A00051	S12	Presente Estudio
<i>Anomalocosmoecus</i>	I_A00109	S44	Presente Estudio
<i>Anomalocosmoecus</i>	I_A00009	S50	Presente Estudio
<i>Anomalocosmoecus</i>	I_A00085	S45	Presente Estudio
<i>Chironominae</i>	I_A00047	S50	Presente Estudio
<i>Orthocladiinae</i>	I_A00059	S12	Presente Estudio
<i>Podonominae_T3</i>	I_A00043	S50	Presente Estudio
<i>Pentaneura</i>	I_211040	-	Podocarpus
<i>Diamesa</i>	-	-	BOLD ID secuencia: SWRC349_08
<i>Blepharicera_T1</i>	I_A00007	S50	Presente Estudio

<i>Simulium</i>	I_A00021	S50	Presente Estudio
<i>Simulium</i>	I_A00055	S12	Presente Estudio
<i>Simuluim</i>	I_A00073	S45	Presente Estudio
<i>Molophilus</i>	I_210794	-	Podocarpus
<i>Limnophora</i>		-	BOLD ID secuencia: BBDIT772_11
<i>Hemerodromia</i>	-	-	BOLD ID secuencia: CFWIB137_10
<i>Chelifera</i>	-	-	BOLD ID secuencia: GMDAP723_12
<i>Alluaudomyia</i>	I_A00093	S45	Presente Estudio
<i>Scirtes</i>	I_A00099	S45	Presente Estudio
<i>Neoelmis_T2</i>	I_A00015	S50	Presente Estudio
<i>Neoelmis</i>	I_A00077	S45	Presente Estudio
<i>Claudioperlatigrina</i>	-	-	BOLD ID secuencia: ANAC022_14

Tabla 2. Protocolos de amplificación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para el gen Citocromo Oxidasa I (COI).

Gen	Protocolos PCR				
COI	Insectos ADH modificado (md)	Denaturación inicial	94°C	5 min	35X
		Denaturación	94°C	30 seg	
		Annealing	52°C	30 seg	
		Extensión	72°C	45 seg	
		Extensión final	72°C	7min	
	12s 16s 42		94°C	2 min	30X
			42°C	30 seg	
			72°C	1 min	
			94°C	30 seg	
			42°C	30 seg	
			72°C	1 min	
			94°C	30 seg	
			50°C	30 seg	
			72°C	1 min	
			72°C	5 min	
	12s 16s 42 md	1 ciclo	94°C	2 min	
			42°C	30 seg	
			72°C	1 min	
		5 ciclos	94°C	30 seg	
			42°C	30 seg	
			72°C	1 min	
		22 ciclos	94°C	30 seg	
			50°C	30 seg	
			72°C	1 min	
			72°C	5 min	
	12s 16s-42-48	1 ciclo	94°C	2 min	
			42°C	30 seg	
			72°C	1 min	
		10 ciclos	94°C	30 seg	
			42°C	30 seg	
			72°C	1 min	
		22 ciclos	94°C	30 seg	
			48°C	30 seg	
			72°C	1 min	
			72°C	5 min	
	4°C				

Tabla 3. Cargas de las variables, autovalores y porcentaje de variación resultantes del análisis de componentes principales entre siete variables ambientales.

	PC1	PC2
Clorofila a	0.62	-0.24
pH	-0.08	-0.40
Conductividad	0.87	-0.15
Temperatura	0.54	0.57
Turbidez	-0.78	-0.35
Pendiente	0.05	0.74
Ancho (cm)	0.54	-0.68
Autovalores	2.3310	1.6994
Porcentaje de variación	33.30	24.28

12. ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de extracción de ADN con CTAB (invertebrados).

1. Colocar la muestra de tejido en 500 µl de 0,1X TE buffer. Dejar toda la noche al tejido en el buffer a 4° C.
2. Descartar el tejido donde se rehidrató el tejido.
3. Colocar 50 µl de 0,1X TE buffer y macerar el tejido usando un micropistilo (si el tejido es muy grande, se puede cortarlo en pedazos más pequeños). Antes de desechar el micropistilo, lavarlo con 100 µl de 0,1X TE buffer. Nota: No utilizar más de 100 µl de 0,1X TE buffer.
4. Añadir 500 µl de solución CTAB-PVP y 16 µl de proteinasa K (200mg/ml). Incubar por 4-6 horas a 56°C. Mezclar en el vórtex constantemente.
5. Colocar un volumen igual (650 µl) de cloroformo/alcoholo isoamílico (24:1). Mezclar hasta formar una emulsión y centrifugar por 10 minutos 13000 rpm.
6. Recuperar la parte acuosa y añadir 2-2,5 volúmenes de isopropanol 100%. Incubar a -20°C por 2-2,5 horas (min. 30 minutos). Centrifugar 10 min. 13000 rpm.
7. Descartar el isopropanol y lavar el pellet con 300 µl de etanol 70%. Centrifugar 12 min. 13000 rpm.
8. Descargar el etanol y dejar secar el pellet.
9. Resuspender el pellet en 25 µl de 0,1X TE buffer.
10. Esperar mínimo dos horas antes de cuantificar. Antes de cuantificar el ADN, llevar la muestra a temperatura ambiente y homogenizarla.

Anexo 2. Puntos de calibración utilizados para la construcción del árbol ultramétrico (Misof et al., 2014) Material Suplementario.

Table S25. Estimated divergence dates based on 37 calibration points. Median: median of annotated trees, Upper CI: median of the upper 95% confidence interval (CI), Lower CI: median of the lower 95% confidence interval across 105 meta-partitions (or subsets respectively). 10,000 trees were uniformly sampled from each partition from post-burn-in trees only collected during analyses. Node IDs refer to clades in Figure 1 and Figure S23. Divergence times in million years ago (Ma). Fossil numbers refer to Table S9.

Clade	Node ID	Median	Upper CI	Lower CI	calibrated with Fossil Number
Myriapoda	1	407,246727	561,801845	148,200526	
	2	121,306895	284,205595	2,702351	
crustaceans: Malacostraca	3	254,208654	457,406266	79,626553	
crustaceans: Ostracoda + Malacostraca	4	468,478941	524,241231	425,000797	F1
Copepoda + Branchiopoda	5	399,318382	510,716681	213,375064	F2
	6	134,133920	224,791281	56,783251	
	7	142,407649	236,527006	58,506191	
	8	197,504999	290,759918	111,956243	
Collembola	9	242,694918	346,685220	148,200745	
Protura + Collembola	10	430,065330	447,729980	411,500626	F3
Diplura	11	303,399600	441,769087	141,546497	F4
Archaeognatha	12	145,645264	325,015924	33,292334	
	13	160,229784	335,226898	41,415697	
Zygentoma	14	214,104043	396,010897	86,362594	
	15	70,815895	143,506673	18,967269	
	16	110,647144	195,622982	43,094312	
Ephemeroptera	17	178,820633	284,425808	90,365808	
	18	107,079927	116,329217	101,807728	F6
Odonata	19	234,729874	279,091153	221,000003	F5
Palaeoptera	20	362,454433	409,930688	296,876594	
	21	54,757971	93,905949	20,578557	
Thysanoptera	22	119,931395	130,899061	113,967705	F10
	23	80,471105	162,710695	21,551635	
	24	23,001353	57,227285	1,894999	
	25	59,445044	110,457079	20,208830	
	26	167,973875	235,500567	102,579699	
	27	211,865879	277,646727	147,994931	F12
Hemiptera: Sternorrhyncha	28	245,028848	307,096555	182,456208	
	29	108,059844	172,685822	51,915826	
	30	107,603462	117,899810	101,854787	F13
Hemiptera: Heteroptera	31	155,555994	216,602764	111,518843	
	32	105,587665	182,480324	37,044939	
Hemiptera: Auchenorrhyncha	33	169,580237	245,591694	92,531107	
Hemiptera: Coleorrhyncha + Auchenorrhyncha	34	202,586667	276,954171	125,891239	
Hemiptera: ((Coleorrhyncha + Auchenorrhyncha) + Heteroptera)	35	244,475403	308,091627	179,014192	
Hemiptera	36	290,837893	346,079548	232,768338	
Hemiptera + Thysanoptera	37	339,127642	384,047421	281,073592	F11
Phthiraptera	38	53,409541	66,899171	46,399183	F15
	39	106,891780	115,594324	101,822061	F14
Psocodea	40	187,326391	286,124280	118,428836	
	41	107,357114	166,170770	50,408110	
	42	139,150774	196,483408	85,543455	
	43	30,433360	39,614999	25,042342	F19
	44	54,897138	84,242256	30,155540	
	45	54,798820	86,099928	20,891924	F20
	46	97,314035	107,149349	91,766558	F18
	47	121,266344	162,323610	96,227973	
	48	162,407907	212,689298	114,308004	F34
	49	187,880253	241,415720	130,908247	

Hymenoptera	50	239,527112	283,732831	221,000034	F16
	51	102,013183	172,432025	37,166005	
	52	166,911767	224,639196	92,942567	
	53	222,045504	250,072058	207,000006	F26
	54	211,967351	219,291596	207,474496	F24
	55	233,749969	258,677857	213,181815	
	56	250,043653	275,979408	225,562552	
Coleoptera	57	269,975985	293,878103	246,198986	
Strepsiptera	58	107,558960	117,882726	101,862029	F25
Coleoptera + Strepsiptera	59	286,472908	305,999824	264,954519	F23
	60	101,620750	176,564319	35,148491	
	61	166,879172	235,037671	88,695921	
Neuroptera	62	224,708585	266,404287	153,636758	F22
Megaloptera	63	212,386385	254,990892	160,500121	F20
Megaloptera + Neuroptera	64	259,034097	277,335136	252,300008	F21
Rhaphidioptera	65	95,129030	202,539853	22,346446	
Neuropterida	66	276,257476	299,269610	257,421487	
(Neuropterida + (Coleoptera + Strepsiptera))	67	307,708572	331,502486	284,520115	
	68	75,208223	129,010417	29,341730	
	69	27,337696	41,673560	11,934750	
	70	42,228768	52,551463	36,185546	F32
	71	59,452788	81,971379	41,569986	
	72	68,698843	95,145039	47,242577	
	73	81,303783	111,679317	55,806173	
	74	108,293609	147,236353	73,770764	
	75	129,689769	175,200580	89,535589	
	76	92,680641	145,651307	42,308746	
	77	122,523012	174,129436	74,943619	
	78	143,790571	191,074147	99,219772	
Diptera	79	157,833991	206,278993	107,261303	F31
	80	34,537152	77,854175	5,671240	
Siphonaptera	81	86,089283	135,293847	38,569660	
	82	58,746205	90,116252	26,643873	
	83	94,330576	114,959654	66,180467	
Mecoptera	84	108,558252	121,664893	101,851222	F37
Siphonaptera + Mecoptera	85	167,548965	176,399791	162,424572	
Antliophora	86	242,742833	290,872046	194,349266	
	87	41,455875	49,785546	36,201540	F29
	88	39,789639	59,215274	20,247675	
	89	55,809257	71,081398	42,678922	
	90	67,063213	82,919508	51,511811	
	91	79,821984	94,031909	63,937318	
	92	100,924483	108,747339	96,192393	F28
	93	116,963001	137,808443	102,983225	
	94	127,653288	155,137246	109,063942	
Lepidoptera	95	141,465392	177,985354	116,448026	F27
	96	109,717536	175,899591	45,497493	
	97	80,056990	141,285319	25,872036	
	98	125,994382	183,745794	71,953113	
Trichoptera	99	154,319849	215,266434	98,291605	
Amphiesmenoptera	100	207,200741	264,179842	154,702258	
Amphiesmenoptera + Antliophora	101	289,649508	328,628021	244,108686	
Aparaglossata	102	326,691600	353,049168	301,864480	

Holometabola	103	344,679769	372,428461	317,797467	F17
Psocodea + Holometabola	104	361,532244	389,979565	333,668870	
((Thysanoptera + Hemiptera) + (Psocodea + Holometabola	105	373,286722	401,367386	345,507553	
Dermaptera	106	79,386187	130,785966	31,732513	
Zoraptera + Dermaptera	107	168,523376	179,908552	162,442696	F33
	108	107,804179	119,070844	101,837014	
Plecoptera	109	167,411199	176,033903	162,415291	F7
	110	29,604555	83,276325	0,000122371	
Mantodea	111	74,183654	153,404634	14,497847	
	112	122,541126	141,888980	58,560010	
Isoptera	113	135,833317	142,331845	131,771642	F9
	114	143,987329	161,717293	133,502932	
	115	158,099980	184,716461	138,677567	
Paraphyletic blattodeans + Isoptera	116	172,975678	208,301223	145,785768	
Dictyoptera	117	197,319693	243,091254	158,914234	
Embioptera	118	43,473131	102,163299	6,050938	F8
	119	46,016608	98,258493	8,464022	
Phasmatodea	120	124,706686	187,235355	66,411227	
Embioptera + Phasmatodea	121	164,221258	214,596187	122,000085	
Grylloblattodea	122	37,575517	93,521105	4,045421	
Mantophasmatodea + Grylloblattodea	123	152,669282	225,473272	72,426534	
((Mantophasmatodea + Grylloblattodea)+(Embioptera+Pha	124	203,735959	259,617901	149,375456	
Dictyoptera + ((Mantophasmatodea + Grylloblattodea) + (E	125	231,271211	286,792623	182,610192	
	126	71,475875	139,042708	19,297823	
	127	129,532992	206,336477	58,500453	
	128	149,035644	231,920416	58,483380	
Orthoptera	129	202,696088	274,429873	126,697097	
Orthoptera + (Dictyoptera + ((Mantophasmatodea + Gryllot	130	247,844578	306,988454	194,686802	
Plecoptera + (Orthoptera + (Dictyoptera + ((Mantophasmat	131	269,115057	334,947991	209,123469	
Polyneoptera incl. Zoraptera	132	302,045426	377,013939	230,971557	
Neoptera	133	386,889134	413,417581	359,505705	
Pterygota	134	406,451228	431,382648	383,600464	F35
Dicondylia	135	420,549060	440,250336	411,500084	F36
Ectognatha	136	440,338670	464,627254	420,890455	
Diplura + Ectognatha	137	461,580256	489,844127	436,678507	
Hexapoda	138	479,124703	509,162636	451,538207	
Remipedia + Hexapoda	139	493,332094	526,539991	461,691378	
((Copepoda + Branchiopoda) + (Remipedia + Hexapoda))	140	508,354315	541,251428	476,092158	
Pancrustacea	141	528,968422	561,403429	493,589469	
Myriapoda + Pancrustacea	142	555,541171	578,747984	522,254390	
Ixodes / ingroup	143	568,824530	579,999990	539,090661	